



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101724621 A

(43) 申请公布日 2010.06.09

(21) 申请号 200910242520.2

(22) 申请日 2009.12.17

(71) 申请人 北京凯泰新世纪生物技术有限公司
地址 100176 北京市北京经济技术开发区中
和街 22 号

(72) 发明人 张增伟 顾燕松 周浩 张文波
闵瑞

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C12N 11/08 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种微载体固定化脂肪酶及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种微载体固定化脂肪酶及其制备方法。该方法,包括下述步骤:1) 脂肪酶复合液的制备:在脂肪酶溶液中加入所述脂肪酶溶液重量的 1%~60% 的载体合成用组分,混合均匀得到脂肪酶复合液;2) 将步骤 1) 制备的脂肪酶复合液经喷雾干燥得到微载体固定化脂肪酶;所述载体合成用组分是含有预聚物的溶液、分散液或乳液;所述预聚物是聚丙烯酸酯类、聚氨酯类或二者任意比例混合的组分。该方法实现微型载体制备和脂肪酶固定化同时完成;该方法工艺简单,制备的微载体固定化脂肪酶具有通用性强、活性高、易于从反应体系中分离、重复利用性好等优点。

1. 一种微载体固定化脂肪酶的制备方法,包括下述步骤:

1) 脂肪酶复合液的制备:在脂肪酶溶液中加入所述脂肪酶溶液重量的1%~60%的载体合成用组分,混合均匀得到脂肪酶复合液;

2) 将步骤1)制备的脂肪酶复合液经喷雾干燥得到微载体固定化脂肪酶;

所述载体合成用组分是预聚物分散到水中得到的溶液、分散液或乳液;所述预聚物是聚丙烯酸酯、聚氨酯或二者任意比例混合的组分;所述百分含量为重量百分含量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述聚丙烯酸酯是以丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸甲酯、丙烯酸异辛酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯、醋酸乙烯和丙烯酸中两种或三种以上任意组合为单体进行聚合反应得到的共聚物;所述聚氨酯是多异氰酸酯与低聚多元醇的嵌段共聚物;所述低聚多元醇优选为聚醚二醇或聚酯二醇,所述多异氰酸酯为芳香族异氰酸酯或脂肪族二异氰酸酯;所述芳香族异氰酸酯优选为甲苯二异氰酸酯或二苯甲烷二异氰酸酯,所述脂肪族二异氰酸酯优选为六次亚甲基二异氰酸酯。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述脂肪酶复合液的脂肪酶活力范围为0~50000U/g溶液但不包括0U/g溶液;优选为3000~20000U/g溶液;特别优选为3000~18000U/g溶液。

4. 根据权利要求1-3中任意一项所述的方法,其特征在于:所述步骤1)中还包括将所述脂肪酶溶液中加入质量百分浓度为1~10%的通用酶稳定剂,所述通用酶稳定剂为PEG、明胶和海藻糖中的一种或两种以上任意混合;所述载体合成用组分的添加量为所述脂肪酶溶液重量的6%~60%,优选为12%~60%,特别优选为20%~60%;所述百分含量为重量百分含量。

5. 根据权利要求1-4中任意一项所述的方法,其特征在于:所述载体合成用组分的含固量为2%~66%,优选含固量为25%~50%。

6. 根据权利要求1-5中任意一项所述的方法,其特征在于:所述聚丙烯酸酯优选为下述1)-6)中任意一项所述的共聚物:

1) 丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯按质量分数比为(1~3):(1~4):(2~6)的比例聚合反应得到的共聚物;

2) 丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯按质量分数比为1.1:1.3:2的比例聚合反应得到的共聚物;

3) 丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸和丙烯酸异辛酯按质量分数比为6:4:3:2的比例聚合反应得到的共聚物;

4) 丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯按质量分数比为1:1:2的比例聚合反应得到的共聚物;

5) 丙烯酸乙酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯按质量分数比为3:2:1:2的比例聚合反应得到的共聚物;

6) 丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸甲酯和醋酸乙烯按质量分数比为2:1:3:6的比例聚合反应得到的共聚物;

所述聚氨酯优选为下述1)-4)中任意一项所述的共聚物:

1) 甲苯二异氰酸酯与聚醚二醇按照物质的量比为3:2的比例聚合得到的共聚物;

2) 甲苯二异氰酸酯与聚酯二醇按照物质的量比为3:1的比例聚合得到的共聚物;

3) 六次亚甲基二异氰酸酯与聚酯二醇按照物质的量比为 2 : 1 的比例聚合得到的共聚物；

4) 二苯甲烷二异氰酸酯与聚酯二醇按照物质的量比为 9 : 2 的比例聚合得到的共聚物。

7. 根据权利要求 1-6 中任意一项所述的方法,其特征在于:当所述预聚物是聚丙烯酸酯和聚氨酯混合的组分时,所述聚丙烯酸酯和聚氨酯的质量比优选为 (1-4) : (1-2);更优选为 1 : 1、3 : 2 或者 4 : 1;所述低聚多元醇的重均分子质量为 0.4 ~ 3.1kDa;所述脂肪酶溶液为脂肪酶发酵液或脂肪酶纯粉水溶液。

8. 根据权利要求 1-7 中任意一项所述的方法,其特征在于:所述喷雾干燥时干燥风在干燥室入口处的温度为 100 ~ 360℃,优选为 126 ~ 220℃,最优选为 126-210℃;干燥室出口温度为 10 ~ 98℃,优选为 60-90℃;所述方法中,整个喷雾过程时间为 60 秒以下,优选为 10-55 秒。

9. 根据权利要求 1-8 中任意一项所述的方法,其特征在于:所述方法中,还包括将微载体固定化脂肪酶控制含水量;所述控制含水量是采用自然晾干、真空冷冻干燥或在 0℃至 90℃下真空干燥,使固定化酶的含水量控制在 15%以下,优选为使固定化酶的含水量控制在 2 ~ 6%;所述真空干燥的温度优选为 25-80℃,最优选 30-75℃。

10. 权利要求 1-9 中任意所述的方法制备的微载体固定化脂肪酶。

一种微载体固定化脂肪酶及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种微载体固定化脂肪酶及其制备方法。

背景技术

[0002] 生物酶的固定化技术是酶工程的核心内容之一,它有效地克服了游离酶在工业化应用中稳定性差、耐热性差、不能重复利用以及不易与产物分离的缺点,极大地推动了生物酶在各个领域的应用,促进了生物技术的迅猛发展。脂肪酶是工业上应用较广的一种酶,它能够在油-水界面上催化水解、酯化、转酯化、内酯合成、多肽合成及手性化合物的拆分等多种反应。脂肪酶的固定化技术已经成为决定脂肪酶应用的关键技术。

[0003] 脂肪酶固定化的方法有很多种,比较常见的方法包括:吸附法、共价结合法、包埋法和微囊法等。脂肪酶固定化可以只采用一种上述方法,有时因特殊需要也往往采用两种及以上的复合方法进行固定化。脂肪酶常用的固定化载体与其他种类的酶固定化用的载体没有太大区别,主要包括天然多孔材料、各类凝胶、合成树脂和复合改性材料等。目前市场上已经有多种商品化的固定化脂肪酶,其中应用较广的固定化脂肪酶是以颗粒状合成树脂为载体,采用共价结合的方法进行固定化的一类酶。这类固定化脂肪酶具有活力较高、酶载量大、使用寿命长的优点,其缺点是工艺复杂,酶分子经过多个步骤、以共价方式结合在预先制备好的载体上,固定化过程酶活损失严重,工艺对酶自身纯度要求也很高。另外此类固定化酶价格很高,一般在每公斤几千元以上,有的甚至超过万元。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种微载体固定化脂肪酶及其制备方法。

[0005] 本发明所提供的微载体固定化脂肪酶的制备方法,包括下述步骤:

[0006] 1) 脂肪酶复合液的制备:在脂肪酶溶液中加入所述脂肪酶溶液重量的1%~60%的载体合成用组分,混合均匀得到脂肪酶复合液;

[0007] 2) 将步骤1)制备的脂肪酶复合液经喷雾干燥得到微载体固定化脂肪酶;

[0008] 所述载体合成用组分是含有预聚物的溶液、分散液或乳液;所述预聚物是聚丙烯酸酯类、聚氨酯类或二者任意比例混合的组分。喷雾过程中载体合成用组分中的预聚物在一定温度下聚合,形成载体。

[0009] 所述方法中,所述载体合成用组分的含固量(固体含量)为2%-66%,优选含固量为9%-50%,特别优选25%~50%;如9%-16%、9%-32%、16%-32%、30-32%、23%-30%、16%-30%、32%、30%、23%、45%、16%、9%。

[0010] 所述方法中,所述脂肪酶复合液的脂肪酶活力范围为0~50000U/g溶液但不包括0U/g溶液;优选为6000~20000U/g溶液,如3000~18000U/g、3000-6000U/g、3000U/g-10489U/g、6000U/g-10489U/g、5000U/g-6000U/g、3000U/g-6153U/g、3000U/g、6000U/g、10489U/g、6153U/g、5000U/g、4000U/g。

[0011] 所述载体合成用组分的添加量为所述脂肪酶溶液重量的6%~60%,优选为

12% -60%，特别优选为 20% -60%，如 6% -20%、20% -30%、6% -30%、43% -60%、30% -43%、20%、6%、30%、43%、60%。

[0012] 所述方法中，所述脂肪酶溶液根据需要可以加入质量百分浓度为 1 ~ 10% 的通用酶稳定剂，所述通用酶稳定剂为 PEG、明胶和海藻糖中的一种或两种以上任意混合。通用酶稳定剂的添加量可为 10%、5%、2%、1%；PEG 可为 PEG8000、PEG6000 等。

[0013] 所述方法中，所述聚丙烯酸酯是以丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸甲酯、丙烯酸异辛酯、丙烯酸乙烯酯、甲基丙烯酸甲酯、醋酸乙烯和丙烯酸中两种或三种以上任意组合为单体进行聚合反应得到的共聚物；所述聚氨酯是多异氰酸酯与低聚多元醇的嵌段共聚物；所述低聚多元醇优选为聚醚二醇或聚酯二醇，所述多异氰酸酯为芳香族异氰酸酯或脂肪族二异氰酸酯；所述芳香族异氰酸酯优选为甲苯二异氰酸酯或二苯甲烷二异氰酸酯，所述脂肪族二异氰酸酯优选为六次亚甲基二异氰酸酯。

[0014] 所述聚丙烯酸酯优选为下述 1)-6) 中任意一项所述的共聚物：

[0015] 1) 丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯按质量分数比为 (1 ~ 3) : (1 ~ 4) : (2 ~ 6) 的比例聚合反应得到的共聚物；

[0016] 2) 丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯按质量分数比为 1.1 : 1.3 : 2 的比例聚合反应得到的共聚物；

[0017] 3) 丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸和丙烯酸异辛酯按质量分数比为 6 : 4 : 3 : 2 的比例聚合反应得到的共聚物；

[0018] 4) 丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯按质量分数比为 1 : 1 : 2 的比例聚合反应得到的共聚物；

[0019] 5) 丙烯酸乙酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸乙烯酯和甲基丙烯酸甲酯按质量分数比为 3 : 2 : 1 : 2 的比例聚合反应得到的共聚物；

[0020] 6) 丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸甲酯和醋酸乙烯按质量分数比为 2 : 1 : 3 : 6 的比例聚合反应得到的共聚物；

[0021] 所述聚氨酯优选为下述 1)-4) 中任意一项所述的共聚物：

[0022] 1) 甲苯二异氰酸酯与聚醚二醇按照物质的量（摩尔）比为 3 : 2 的比例聚合得到的共聚物；

[0023] 2) 甲苯二异氰酸酯与聚酯二醇按照物质的量（摩尔）比为 3 : 1 的比例聚合得到的共聚物；

[0024] 3) 六次亚甲基二异氰酸酯与聚酯二醇按照物质的量（摩尔）比为 2 : 1 的比例聚合得到的共聚物；

[0025] 4) 二苯甲烷二异氰酸酯与聚酯二醇按照物质的量（摩尔）比为 9 : 2 的比例聚合得到的共聚物。

[0026] 当所述预聚物是聚丙烯酸酯和聚氨酯混合的组分时，所述聚丙烯酸酯和聚氨酯的质量比优选为 (1-4) : (1-2)；更优选为 1 : 1、3 : 2 或者 4 : 1；所述低聚多元醇的重均分子质量为 0.4 ~ 3.1kDa，如，当低聚多元醇为聚醚二醇时，其重均分子量可为 1.9kDa，当低聚多元醇为聚酯二醇时，其重均分子量可为 2.3kDa、1.2kDa、1.3kDa。

[0027] 所述方法中，所述脂肪酶溶液为脂肪酶发酵液或脂肪酶纯粉水溶液。

[0028] 所述方法中，喷雾干燥应理解为通常所说的干燥方法，是液态物料雾化后水份经

迅速蒸发而除去的干燥方法。所述方法中,所述喷雾干燥时干燥风在干燥室入口处的温度为 100 ~ 360℃,优选为 126 ~ 220℃,最优选为 126-210℃,如 126℃ -160℃、126℃ -170℃、126℃ -170℃、126℃ -190℃、160℃ -180℃、170℃ -190℃、190℃ -210℃、180℃、160℃、170℃、190℃、210℃、126℃;干燥室出口温度为 10 ~ 98℃,优选为 60-90℃,如 60-65℃、60-70℃、65℃ -70℃、70℃ -90℃、80℃ -90℃、60-75℃、75℃ -80℃、60℃、65℃、70℃、90℃、80℃、75℃;所述方法中,整个喷雾过程时间为 60 秒以下,优选为 10-55 秒,如 48-55 秒、25-35 秒、45-50 秒、30-36 秒、10-16 秒、20-25 秒、10-20 秒、10-30 秒 25-45 秒、16-25 秒、16-36 秒。喷雾干燥采用的雾化方式不限,可以是离心式、压力式和气流式,优选为离心式。喷雾干燥的同时固定化载体合成用组分在高温下发生聚合反应合成颗粒状微载体,同时脂肪酶分子通过共价结合或包埋的方式实现固定化。

[0029] 所述方法中,还包括将微载体固定化脂肪酶控制含水量;所述控制含水量是是将采用自然晾干、真空冷冻干燥或在 0℃ 至 90℃ 下真空干燥,使固定化酶的含水量控制在 15% 以下,优选为使固定化酶的含水量控制在 2 ~ 6%;所述真空干燥的温度优选为 25-80℃,最优选 30-75℃;

[0030] 喷雾干燥制备的微载体固定化脂肪酶的水解活力可在 0 ~ 400000U/g,基本能够达到 100000 ~ 200000U/g。

[0031] 本发明所提供的微载体固定化脂肪酶是上述方法制备的固定化脂肪酶,具有易于从反应体系中分离和反复利用的特点。

[0032] 本发明的固定化脂肪酶的制备方法含脂肪酶复合液的制备,实现脂肪酶液与载体合成用预聚物(或称预聚体,单体经初步聚合而成的物质,是可反应性半成品)充分混合;复合液经喷雾干燥制备微载体固定化酶,实现微型载体制备和脂肪酶固定化同时完成。该方法工艺操作简单,便于工业化连续性生产。该制备方法中载体的制备和脂肪酶固定化同时完成;在合成固定化用载体的同时,脂肪酶分子可以通过共价结合或包埋的方式实现固定化,其中共价结合是通过脂肪酶分子非活性位点与载体中活性基团在高温下结合实现的。本发明的方法具有步骤少、过程短、酶活损失少的特点,市场应用前景广阔。

[0033] 本发明的方法可以将脂肪酶发酵液直接转化成固定化脂肪酶,改变了传统的脂肪酶先提取后进行固定化的工艺,最大程度上减少了酶处理过程中的损失,通过喷雾制备微载体固定化酶活收率最高能够达到 96% 以上。

[0034] 本发明的方法工艺简单,制备的微载体固定化脂肪酶粒径在 300 μ m 以下,基本为 5-85um,这样的粒径使其比表面积大,具有通用性强、活性高、易于从反应体系中分离、重复利用性好等优点。

[0035] 本发明的微载体固定化脂肪酶能够催化各类酯化、转酯化反应,通过实验证明该酶可成功用于在棕榈酸异辛酯合成、地沟油甲酯化、维生素 A 棕榈酸酯合成和鱼油乙酯化等领域,并且表现出较高的催化活性。

附图说明

[0036] 图 1 为本发明固定化脂肪酶的电镜扫描图。

具体实施方式

[0037] 下述实施例所述的方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0038] 下述实施例中的百分含量,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0039] 下述实施例中,脂肪酶活力均用橄榄油水解方法测定(行业标准 QB/T1803-1993)。

[0040] 实施例 1、本发明固定化脂肪酶的制备及其效果验证

[0041] 1、本发明固定化脂肪酶的制备

[0042] 从市场上购买深圳市绿微康生物工程有限公司产脂肪酶原料 LVK-F,活力 30000U/g,用水溶解脂肪酶原料 LVK-F 获得脂肪酶溶液,加入 PEG6000,使其质量百分浓度为 10%,混合均匀后加入脂肪酶溶液质量 20%的载体合成用组分(预聚物分散在水中获得的乳液,其中预聚物为聚丙烯酸酯类组分,由重量分数比为 1.1 : 1.3 : 2 的丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯聚合反应得到的共聚物,载体合成用组分含固量 32%,聚合物相对分子质量分布范围为 15 ~ 50kDa(重均分子量 37kDa)),混合均匀后得到混合液体即为脂肪酶复合液,脂肪酶活力为 3000U/g。

[0043] 将 500g 上述获得的脂肪酶复合液(总共含 1500000U 脂肪酶)用江阴市干燥机械厂 QP 系列 II 型喷雾干燥器进行喷雾固定化,喷雾条件干燥室进口温度 126℃,出口温度 60℃,雾化方式为气流式,喷雾过程时间(料液雾化进入干燥塔到收集器的时间)为 20-25 秒。喷雾干燥时,载体合成用组分在高温下发生聚合反应合成颗粒状微载体,同时脂肪酶分子通过共价结合或包埋的方式实现固定化。喷雾完成后,23℃自然晾干至含水量 7%,得到 87g 微载体固定化脂肪酶。

[0044] 2、本发明微载体固定化脂肪酶进行活力测定的效果验证

[0045] 将步骤 1 获得的制备的微载体固定化脂肪酶用橄榄油水解方法检测(行业标准 QB/T 1803-1993),结果表明获得的微载体固定化脂肪酶活力为 13800U/g,粒径在 10 ~ 45 μm,整个制备过程总酶活力收率(总酶活力收率=微载体固定化脂肪酶总活力/喷雾前酶液总活力 × 100%)为 80.5%。活力测定完成后,将微载体固定化脂肪酶从反应体系中分离出来再进行活力测定,重复 6 次,以上述初次测定结果为 100%,分离出微载体固定化脂肪酶重复 6 次的测定的活力都保持在初始活力的 80%以上。

[0046] 实施例 2、本发明固定化脂肪酶的制备及其效果验证

[0047] 1、本发明固定化脂肪酶的制备

[0048] 以亚罗解脂酵母(*Yarrowia lipolytica*)(保藏编号 CGMCC NO. 1470,专利公布号为 CN 1948470A;专利申请号为 200510112638.5)为生产菌株,在装有 600L 发酵培养基(培养基为将豆粕 10g/L、豆油 20g/L、K₂HPO₄ 0.1g/L、KH₂PO₄ 0.1g/L、消泡剂 0.1g/L 混于水中获得的液体培养基)的发酵罐中,在 28℃下发酵,过滤得到 6000U/g 的脂肪酶发酵液,经硫酸铵分级沉淀(使硫酸铵的饱和度依次分别达到 35%、80%,收集达到 80%的沉淀)获得脂肪酶纯粉,活力 200000U/g。脂肪酶纯粉用水溶解获得脂肪酶溶液。

[0049] 在上述获得的脂肪酶溶液中加入海藻糖,使海藻糖质量百分浓度为 5%,混合均匀后加入脂肪酶溶液质量 6%的载体合成用组分(预聚物分散在水中获得的乳液,其中预聚物为聚丙烯酸酯,预聚物具体是由重量分数比为 6 : 4 : 3 : 2 的丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸和丙烯酸异辛酯聚合而成的聚合物;载体合成用组分含固量 30%,聚合物相对分子

质量分布范围为 20 ~ 52kDa(重均分子量 38kDa),混合均匀后得到混合液体即为脂肪酶复合液,脂肪酶活力 6000U/g。

[0050] 将 800g 上述获得的脂肪酶复合液液体(总共含 4800000U 脂肪酶)用常州市华夏干燥制粒设备有限公司压力式喷雾干燥机 YPG-50 进行喷雾固定化,喷雾条件干燥室进口温度 210℃,出口温度 65℃,雾化方式为压力式(雾化压力 2.5MPa),喷雾时间(料液雾化进入干燥塔到收集器的时间)为 10-16 秒。喷雾干燥时,载体合成用组分在高温下发生聚合反应合成颗粒状微载体,同时脂肪酶分子通过共价结合或包埋的方式实现固定化。喷雾完成后真空冷冻(-15℃)干燥至固定化酶的含水量为 3.6%,得到 37g 微载体固定化脂肪酶。

[0051] 2、本发明微载体固定化脂肪酶进行活力测定的效果验证

[0052] 将步骤 1 获得的制备的微载体固定化脂肪酶用橄榄油水解方法检测(行业标准 QB/T 1803-1993),结果表明获得的微载体固定化脂肪酶活力为 106000U/g,粒径在 30 ~ 85 μm,整个制备过程总酶活力收率为 83%。活力测定完成后将微载体固定化脂肪酶从反应体系中分离出来再进行活力测定,重复 12 次(以上述初次酶活测定为 100%,后面 12 次的活力值都跟第一次测定的活力值比较)活力都保持在 85%以上。

[0053] 实施例 3、本发明固定化脂肪酶的制备及其效果验证

[0054] 1、本发明固定化脂肪酶的制备

[0055] 实施例 2 中发酵液,活力 6000U/g,过滤除去菌体等杂质后超滤浓缩至 15000U/g,然后加入脂肪酶发酵液质量 43%的载体合成用组分(预聚物分散在水中获得的乳液,其中预聚物是质量比为 3 : 2 的聚丙烯酸酯与聚氨酯组分,总含固量 23%,其中聚丙烯酸酯是丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯按重量份数比为 1 : 1 : 2 的比例聚合反应得到的共聚物,聚合物相对分子质量分布范围为 20 ~ 50kDa(重均分子量 30kDa);聚氨酯是甲苯二异氰酸酯与聚醚二醇(相对分子质量分布范围为 0.9 ~ 2.7kDa(重均分子量 1.9kDa))按照物质的量(摩尔)比为 3 : 2 的比例聚合得到的共聚物,聚合物分子量分布范围为 25 ~ 60kDa(重均分子量 44kDa)),混合均匀后得到混合液体即为脂肪酶复合液;其活力为 10489U/g。

[0056] 将 5000g 上述获得的液体(总共含 52445000U 脂肪酶)用常州市嘉鹏干燥设备有限公司离心喷雾干燥机 LPG100 进行喷雾固定化,喷雾条件干燥室进口温度 190℃,出口温度 70℃,雾化方式为离心式,喷雾时间(料液雾化进入干燥塔到收集器的时间)为 30-36 秒。喷雾完成后 60℃真空干燥至含水量 4.0%,得到 674g 微载体固定化脂肪酶。

[0057] 2、本发明微载体固定化脂肪酶用于棕榈酸异辛酯的合成的效果验证

[0058] 将步骤 1 获得的制备的微载体固定化脂肪酶用橄榄油水解方法检测(行业标准 QB/T 1803-1993),结果表明步骤 1 制备的微载体固定化酶活力为 70000U/g,粒径在 5 ~ 35 μm,整个制备过程总酶活力收率为 90%。

[0059] 将步骤 1 制备的固定化脂肪酶按照下述反应体系连续进行多次催化酯化反应: 0.100g 步骤 1 制备的固定化酶,1.000g 棕榈酸,0.508g 异辛醇(酸醇摩尔比为 1 : 1),5mL 正己烷。将反应体系在 40℃,160r/min 摇床,反应 12 小时。每次催化反应后,将所用固定化酶取出,经正己烷清洗后,重新放入新的上述相同体系继续反应。每次反应后,采用酸碱滴定确定酯化率(酯化率 = (1 - 反应完后剩余酸量 / 反应前酸总量) × 100%),记录反应酯化率仍保持在 90%以上的反应次数。结果表明酯化率在 90%以上的反应次数为 46 次,

结果表明上述微载体固定化脂肪酶表现出较高活性和使用寿命。

[0060] 实施例 4、本发明固定化脂肪酶的制备及其效果验证

[0061] 1、本发明固定化脂肪酶的制备

[0062] 以亚罗解脂酵母 (*Yarrowia lipolytica*) (保藏编号 CGMCC NO. 1470, 专利公布号为 CN 1948470A; 专利申请号为 2005101 12638.5) 为生产菌株, 在装有 3600L 发酵培养基 (培养基为将豆粕 15g/L、豆油 26g/L、 K_2HPO_4 0.1g/L、 KH_2PO_4 0.1g/L、消泡剂 0.3g/L 混于水中获得的液体培养基) 的发酵罐中, 温度 28℃ 下发酵。取新下罐发酵液, 该发酵液脂肪酶水解活力为 8000U/g 发酵液, 过滤除去菌体等杂质, 加入脂肪酶发酵液质量 30% 的载体合成用组分 (预聚物分散在水中获得的乳液, 预聚物是质量比为 4 : 1 的聚丙烯酸酯与聚氨酯组分, 总含固量 45%; 其中聚丙烯酸酯是丙烯酸乙酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸甲酯按照质量比为 3 : 2 : 1 : 2 聚合反应得到的共聚物, 聚合物相对分子质量分布范围为 36 ~ 62kDa (重均分子量 49kDa); 聚氨酯是六次亚甲基二异氰酸酯与聚酯二醇 (相对分子质量分布范围为 1.5 ~ 3kDa (重均分子量 2.3kDa)) 按照 2 : 1 的物质的量 (摩尔) 比聚合得到的共聚物, 聚合物分子量分布范围为 55 ~ 106kDa (重均分子量 79kDa)) 混合均匀后得到混合液体即为脂肪酶复合液; 其活力为 6153U/g。

[0063] 将 12000g 上述获得的液体 (总共含 73836000U 脂肪酶) 进行喷雾固定化, 喷雾条件干燥室进口温度 170℃, 出口温度 90℃, 雾化方式为离心式 (仪器同实施例 3), 喷雾时间 (料液雾化进入干燥塔到收集器的时间) 为 45-50 秒。喷雾完成后 80℃ 真空干燥至含水量 4.3%, 得到 424g 微载体固定化脂肪酶。图 1 为该固定化脂肪酶的电镜扫描图。

[0064] 2、本发明微载体固定化脂肪酶用于催化合成脂肪酸甲酯反应的效果验证

[0065] 将步骤 1 获得的制备的微载体固定化脂肪酶用橄榄油水解方法检测 (行业标准 QB/T 1803-1993), 结果表明步骤 1 制备的微载体固定化酶活力为 160000U/g, 粒径范围在 5 ~ 50 μ m, 整个制备过程总酶活力收率为 92%。

[0066] 将步骤 1 制备的固定化脂肪酶按照下述反应体系连续进行多次催化转酯化反应: 0.01g 步骤 1 制备的固定化酶, 2g 地沟油 (酸值 120mgKOH/g), 5ml 正己烷, 0.1g 水, 279 μ l 甲醇。将反应体系在 40℃, 170r/min 摇床, 反应 12 小时。每次催化反应后, 将所用固定化酶取出, 经正己烷清洗后, 重新放入新的上述相同体系继续反应。每次反应后均用气相色谱法测定脂肪酸甲酯的含量, 计算转酯化率 (气相色谱分析中面积归一积分法, 目标产物面积占总面积的比率), 记录反应酯化率仍保持在 90% 以上的反应次数。结果显示, 步骤 1 制备的微载体固定化脂肪酶均能够连续 31 次催化上述转酯化反应, 且转化率均在 90% 以上。

[0067] 实施例 5、本发明固定化脂肪酶的制备及其效果验证

[0068] 1、本发明固定化脂肪酶的制备

[0069] 取实施例 4 发酵液, 经 1000g, 10 分钟离心, 收集上清液, 加入明胶和 PEG8000, 使明胶和 PEG8000 的质量百分浓度均为 2%, 充分溶解后, 加入脂肪酶溶液质量 60% 的载体合成用组分 (预聚物分散在水中获得的乳液, 预聚物是质量比为 1 : 1 的聚丙烯酸酯和聚氨酯组分, 总含固量 16%, 其中聚丙烯酸酯是丙烯酸丁酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸甲酯、醋酸乙酯按照 2 : 1 : 3 : 6 的质量比聚合反应得到的共聚物, 聚合物相对分子质量分布范围为 39 ~ 55kDa (重均分子量 46kDa); 聚氨酯是甲苯二异氰酸酯与聚酯二醇 (相对分子质量分布范围为 0.9 ~ 1.5kDa (重均分子量 1.2kDa)) 按照 3 : 1 的物质的量 (摩尔) 比聚合得到的共

聚物, 聚合物分子量分布范围为 32 ~ 51kDa (重均分子量 38kDa) 混合均匀即为脂肪酶复合液; 测定表明其活力为 5000U/g。

[0070] 取 1000g 上述混合溶液 (总共含 5000000U 脂肪酶) 进行喷雾固定化, 设备同实施例 3, 喷雾条件干燥室进口温度 160℃, 出口温度 80℃, 雾化方式为离心式, 喷雾时间 (料液雾化进入干燥塔到收集器的时间) 48-55 秒, 喷雾完成后 40℃ 真空干燥至含水量 2%。得到 90g 固定化脂肪酶。

[0071] 2、本发明微载体固定化脂肪酶用于合成维生素 A 棕榈酸酯反应的效果验证

[0072] 将步骤 1 获得的制备的微载体固定化脂肪酶用橄榄油水解方法检测 (行业标准 QB/T 1803-1993), 结果表明步骤 1 制备的微载体固定化酶活力为 48000U/g, 粒径范围在 20 ~ 55 μm, 整个制备过程总酶活力收率为 88%。

[0073] 以维生素 A 醋酸酯和棕榈酸为底物, 两者摩尔比 1 : 1, 加入维生素 A 醋酸酯重量 1% 的步骤 1 制备的微载体固定化酶, 40℃, 160r/min 摇床, 反应 9 小时。结果显示, 步骤 1 制备的微载体固定化脂肪酶均能够连续 18 次催化上述反应, 且转化率均在 77 ~ 79%。

[0074] 实施例 6、本发明固定化脂肪酶的制备及其效果验证

[0075] 1、本发明固定化脂肪酶的制备

[0076] 取实施例 4 发酵液, 经 3000g, 10 分钟离心, 收集上清液, 加入明胶, 使明胶的质量百分浓度为 1%, 充分溶解后, 加入脂肪酶溶液质量 12% 的载体合成用组分 (预聚物分散在水中获得的乳液, 总含固量 9%, 预聚物是聚氨酯类组分, 是二苯甲烷二异氰酸酯与聚酯二醇 (相对分子质量分布范围为 0.8 ~ 1.8kDa (重均分子量 1.3kDa)) 按照 9 : 2 的物质的量 (摩尔) 比聚合得到的共聚物, 聚合物分子量分布范围为 16 ~ 56kDa (重均分子量 36kDa)) 混合均匀, 即为脂肪酶复合液, 测定脂肪酶活力为 4000U/g。

[0077] 取 2000g 上述混合溶液 (总共含 8000000U 脂肪酶) 进行喷雾固定化, 设备同实施例 3, 喷雾条件干燥室进口温度 180℃, 出口温度 75℃, 雾化方式为离心式 (离心速度 13000r/s), 喷雾时间 (料液雾化进入干燥塔到收集器的时间) 25-35 秒, 喷雾完成后 25℃ 真空干燥至含水量 1.5%。得到 72g 固定化脂肪酶。

[0078] 2、本发明微载体固定化脂肪酶用于合成鱼油乙酯反应的效果验证

[0079] 将步骤 1 获得的制备的微载体固定化脂肪酶用橄榄油水解方法检测 (行业标准 QB/T 1803-1993), 结果表明步骤 1 制备的微载体固定化酶活力为 104000U/g, 粒径范围在 15 ~ 50 μm, 整个制备过程总酶活力收率为 95%。

[0080] 将步骤 1 制备的固定化脂肪酶按照下述反应体系连续催化多次鱼油乙酯化反应; 粗鱼油 10g, 无水乙醇 1.95ml, 步骤 1 制备的微载体固定化酶为 0.08g。将反应体系在 40℃, 175r/min 摇床, 反应 21 小时。反应完成后离心将酶分离, 反复重复上述反应, 气相色谱法测定甘油三酯的转化率。结果显示, 该微载体固定化脂肪酶能够连续 12 次催化上述反应 (转化率 90% 以上)。

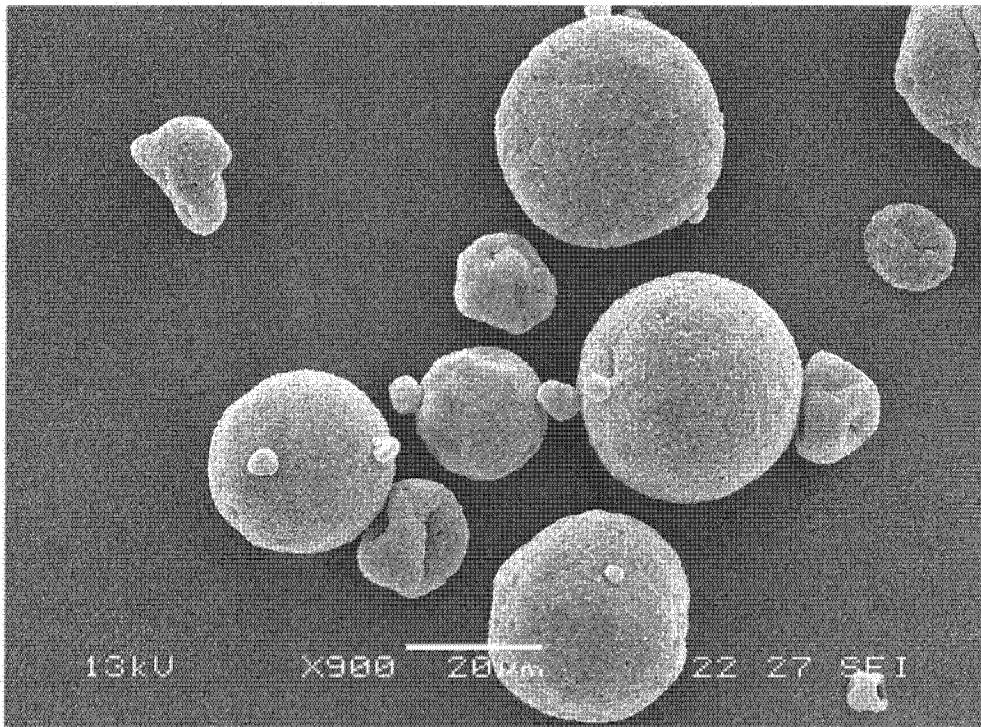


图 1